

FACULTÉ MIXTE
DE
MÉDECINE GÉNÉRALE ET COLONIALE ET DE PHARMACIE
DE MARSEILLE

N^o 2

**MISE AU POINT
DANS UN BUT DE STANDARDISATION
D'UNE MÉTHODE
DE CONTROLE BACTÉRIOLOGIQUE
DES EAUX**

T H E S E

présentée et publiquement soutenue devant la Faculté Mixte de Médecine Générale
et Coloniale et de Pharmacie de Marseille

LE 13 MAI 1942

par

Jean IRUNBERRY

né le 7 Novembre 1914 à Bazas (Gironde)

POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Examineurs de la Thèse	{	MM. VIOLLE	} Président	
		ROUSLACROIX		} Assesseurs
		SAUTET		
		RECORDIER		



IMPRIMERIE F. ROBERT
24, RUE MOUSTIER, 24
M A R S E I L L E

1942

**MISE AU POINT
DANS UN BUT DE STANDARDISATION
D'UNE MÉTHODE
DE CONTROLE BACTÉRIOLOGIQUE
DES EAUX**

**MISE AU POINT
DANS UN BUT DE STANDARDISATION
D'UNE MÉTHODE
DE CONTRÔLE BACTÉRIOLOGIQUE
DES EAUX**

THESE

présentée et publiquement soutenue devant la Faculté Mixte de Médecine Générale
et Coloniale et de Pharmacie de Marseille

LE 13 MAI 1942

par

Jean IRUNBERRY

né le 7 Novembre 1914 à Bazas (Gironde)

POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Examineurs de la Thèse	{	MM. VIOLLE	} Président	
		ROUSLACROIX		} Assesseurs
		SAUTET		
		RECORDIER		



IMPRIMERIE F. ROBERT
24, RUE MOUSTIER, 24
M A R S E I L L E

1942

PERSONNEL ENSEIGNANT DE LA FACULTE MIXTE DE MEDECINE GENERALE ET COLONIALE ET DE PHARMACIE DE MARSEILLE

Doyen : L. CORNIL

Assesseur : F. MERCIER

Doyen Honoraire : L. IMBERT

**Professeurs Honoraires : MM. MOITESSIER, CASSOUTE
OLMER, GAUJOUX, AUBARET-COTTE**

Chargé de Cours Honoraire : M. TIAN

Secrétaire : J. COMTE

Bibliothécaire : M^{me} PEROL

Professeurs :

Anatomie	CORSY
Anatomie Pathologique et Pathologie Expérimentale	CORNIL
Bactériologie	ROUSLACROIX
Chimie Analytique et Hydrologie	RIMATTEI
Chimie Médicale	ROCHE
Clinique Chirurgicale	FIOLLE
Clinique Chirurgicale	BOURDE
Clinique Exotique	HECKENROTH
Clinique des Maladies Nerveuses	ROGER
Clinique Médicale	AUDIBERT
Clinique Médicale	MATTEI
Clinique Médicale	MONGES
Clinique Médicale Infantile	GIRAUD
Clinique Obstétricale	VAYSSIÈRE
Clinique Ophtalmologique	JAYLE
Clinique Oto-Rhino-Laryngologique	BREMOND
Clinique Urologique	CHAUVIN
Histoire Naturelle	GABRIEL
Histologie	ROMIEU
Hygiène Générale et Coloniale	VIOLLE
Médecine Légale	MOSINGER
Parasitologie	JOYEUX
Pathologie Chirurgicale	MOIROUD
Pharmacodynamie et Matière Médicale	F. MERCIER
Pharmacie	VIGNOLI
Physiologie	MALMEJAC
Physique	CHEVALLIER
Thérapeutique	POINSO



Chargé de Cours :

Clinique Dermatologique VIGNE

Agrégés en exercice :

MM. SAUTET
DUBOULOZ
BERTHIER
BALANZARD
BRAHIC
FIGARELLA
ARNOUX
CHOSSON

MM. DELPHAUT
R. IMBERT
PAILLAS
AUDIER
DOR
RECORDIER
SALMON

Agrégés libres :

M. QUINTARET

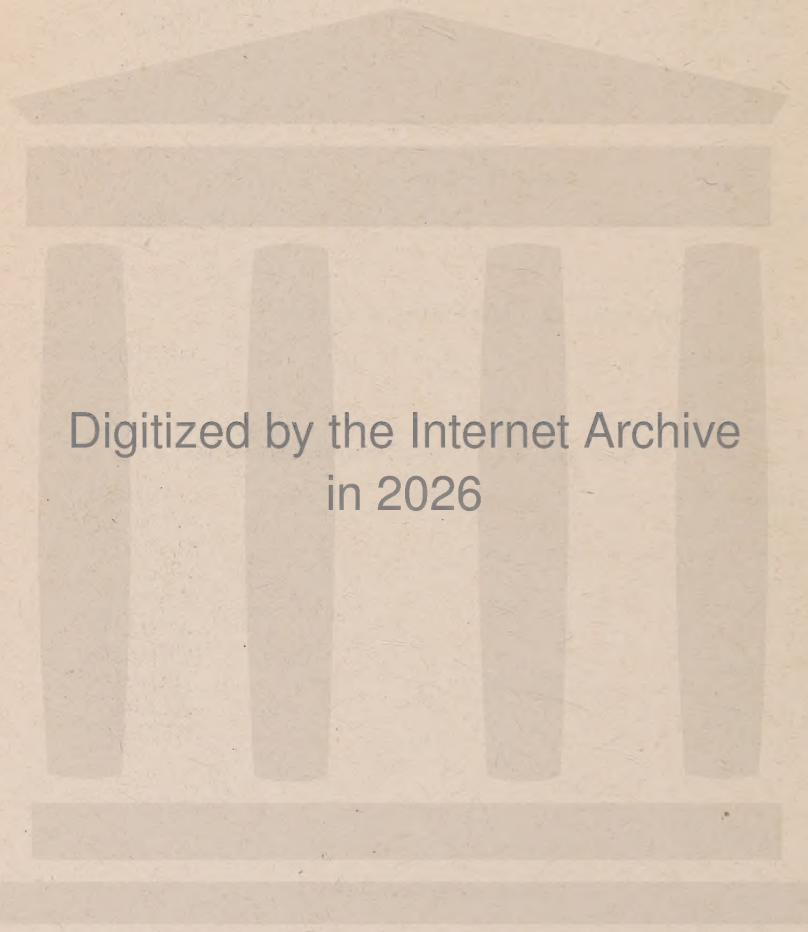
M. PIERI

Chargés des fonctions d'agrégé :

Chimie médicale DERRIEN

Chargés de Cours complémentaires :

<i>Anatomie descriptive et topographique</i>	SALMON
<i>Chimie minérale</i>	ARNOUX
<i>Clinique des maladies contagieuses</i>	PERIOT
<i>Médecine opératoire</i>	DOR
<i>Microbiologie</i>	BOYER
<i>Neuro-Chirurgie</i>	ARNAUD
<i>Obstétrique</i>	CHOSSON
<i>Pharmacodynamie aux Pharmaciens</i>	DELPHAUT
<i>Psychiatrie</i>	ALLIEZ
<i>Toxicologie</i>	GUILLOT



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548806_0036

A LA MEMOIRE DE MON PERE

Mort pour la France.

A MA MERE

A MA SŒUR

AUX MIENS

A MONSIEUR LE PROFESSEUR A. CHEVALLIER

Directeur de l'Institut National d'Hygiène

Hommage respectueux.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR H. VIOLLE

Qui fut pour nous un maître aussi éclairé
que bienveillant et qui a bien voulu accepter
de présider cette thèse.

Qu'il veuille trouver ici l'expression de
notre très grande et très sincère gratitude.

A MON JURY DE THESE

A MONSIEUR LE DOCTEUR FRANCIS F. SCHWENTKER

*Fondateur du Laboratoire de Bactériologie
du Centre de Marseille
de l'Institut de Recherches d'Hygiène*

Sous l'autorité de qui nous eûmes le plaisir
de travailler et qui nous honora de son
amitié.

A MONSIEUR LE DOCTEUR M. RAYNAUD

Qui nous a inspiré l'idée de ce travail et
dont les conseils contribuèrent grandement
à sa réalisation.

INTRODUCTION

On sait que l'eau conditionne la vie et constitue un aliment essentiel de l'homme. Le premier travail d'urbanisme a toujours eu pour but la domestication de l'eau naturelle et son adduction à la cité. On connaît les travaux des Romains dans cet ordre de choses.

De nos jours, l'alimentation de nos grandes villes a posé des problèmes techniques considérables. Mais il fallait attendre l'éclosion de l'« esprit d'hygiène » pour que celui-ci imposât, du moins théoriquement, à cette fourniture d'eau des conditions indispensables de quantité et de qualité.

Du point de vue de la quantité, le problème est à l'heure actuelle généralement résolu. Citons Jules COURMONT qui écrit (1) : « En 1789, Paris n'avait que 12 litres par tête et par jour. On a enfin compris que l'eau était une nécessité sociale. Voici quelques chiffres :

Grenoble	1.000 litres par tête et par jour
Lyon	700 — — —
Paris	650 — — —

Nice	500	—	—	—
Bordeaux ¹	450	—	—	—

En principe, une ville de plus de 50.000 habitants doit fournir 250 litres d'eau par tête et par jour (50 pour la boisson et la cuisine, 200 pour le lavage et les besoins urbains). Une circulaire du ministre de l'Agriculture, de 1934, a fixé le minimum à 125 litres pour les projets d'adduction d'eau. »

Du point de vue de la qualité, l'hygiène distingua l'eau potable et l'eau non potable. L'eau potable est l'eau destinée à l'alimentation humaine ainsi que l'eau utilisée pour les usages individuels.

« L'Annuaire des eaux de France » (1) demandait autrefois pour l'eau potable les conditions suivantes : « Une eau peut être considérée comme bonne et potable quand elle est fraîche, limpide, sans odeur, quand sa saveur est très faible, qu'elle n'est ni désagréable, ni fade, ni salée, ni douceâtre, qu'elle contient peu de matières étrangères, qu'elle est suffisamment aérée et dissout le savon sans former de grumeaux et qu'elle cuit bien les légumes. »

Mais, avec l'ère pasteurienne, il fut montré que l'eau pouvait être le véhicule de nombreuses maladies. Aux exigences d'ordre physique et chimique qu'on était en droit d'attendre des eaux d'alimentation s'ajoutèrent des exigences d'ordre bactériologique.

Actuellement, d'après COURMONT (1), « on peut définir une eau potable celle qui est limpide, fraîche, incolore, inodore, et d'une pureté suffisante pour être consommée avec agrément et sans aucun risque pour la santé. » D'après la commission américaine des Standards of Water Analysis (cité par IMBEAUX, 5), l'eau de distribution doit être :

¹ A Marseille, en 1942, 80 % de la population reçoit 360 litres par tête et par jour.

« 1° Raisonnablement privée de couleur, odeur, goût et turbidité ;

« 2° Raisonnablement privée de sels nocifs en solution ;

« 3° Assurée de ne pouvoir nuire à la santé de l'homme ;

« 4° Enfin, assurée de maintenir ces propriétés en tous temps et quoiqu'il arrive dans la provenance ou le traitement des eaux. »

Ces définitions sont assez vagues. Par contre, le Décret-Loi promulgué par le Ministère français de la Santé Publique, en 1935, fait preuve, à notre avis, d'une intransigeance un peu trop catégorique lorsqu'il prescrit « que tout concessionnaire d'une distribution d'eau potable est tenu de fournir une eau bactériologiquement et chimiquement pure », c'est-à-dire, si nous comprenons bien, de l'eau stérile et distillée.

Comme nous allons le voir, il serait pourtant d'une grande utilité qu'une définition légale de l'eau potable existât.

CHAPITRE I

EAU POTABLE ET COLIBACILLE

Du point de vue de l'hygiéniste, le contrôle bactériologique de l'eau potable est donc essentiel. Sur quoi baser ce contrôle ?

D'abord, comment l'eau peut-elle être dangereuse ? Bien simplement, en servant de véhicule à un germe pathogène — en favorisant parfois la multiplication — et en « distribuant » celui-ci à domicile. On connaît bon nombre de maladies d'origine hydrique, dont certaines peuvent se manifester sous la forme épidémique. Telles sont les fièvres typhoïdiques, le choléra et les dysenteries¹.

Le contrôle idéal serait évidemment de pouvoir rechercher et déceler tous les germes coupables dans l'eau à

¹ Citons le phénomène d'Allen Hazen, selon lequel une diminution de 1 décès par fièvre typhoïde entraîne une diminution de 2 à 3 décès pour l'ensemble des autres maladies. Comme quoi, la qualité de l'eau influe également sur les maladies d'origine non nettement hydrique.

surveiller. Un tel contrôle est de fait impossible. Si l'on peut, dans un but défini et sur un échantillon d'eau déterminé, rechercher telle bactérie pathogène (pour chacune d'elles, de nombreuses techniques de concentration, d'isolement et d'identification ont été proposées), on ne peut évidemment, dans un contrôle courant, soumettre chaque échantillon d'eau à toutes les techniques de recherche, différentes pour chacun des germes infectieux et toujours difficiles, longues et délicates. Cependant, on pourrait prétendre limiter ses recherches à un seul germe pathogène : le bacille d'Eberth, en considérant l'épidémie typhique comme le danger principal. Malheureusement, « la recherche du bacille typhique dans les eaux est une des tâches les plus ardues et les plus aléatoires de la bactériologie. » (BESSON, 3). Et « il est avéré que la recherche du bacille typhique dans les eaux est très difficile, pour ne pas dire illusoire... » (DOPTER, 4).

Faudra-t-il donc s'avouer impuissant à effectuer *pratiquement* le contrôle bactériologique des eaux ? Non, car le résultat a été atteint « par la bande ». Le bacille d'Eberth et les bacilles para-typhiques se transmettent par les déjections de typhiques déclarés ou de porteurs de germes. Si nous prouvons qu'une eau a été souillée par des selles quelconques, nous prouvons la possibilité pour cette eau de contenir du bacille d'Eberth, le « contaminateur » pouvant toujours être *présumé* porteur de germes typhiques. Comment prouver la souillure fécale d'une eau ? En y mettant en évidence un microbe banal : le *Bacterium Coli Commune*, hôte normal de l'intestin, *toujours contenu dans les déjections*.

« Le contenu intestinal semble bien réellement être le milieu normal du Colibacille... Le Colibacille, dont l'origine intestinale apparaît comme si évidente que sa présence doit être considérée comme une véritable *indication de souillure par les matières fécales*, souillure directe ou

indirecte, prochaine ou éloignée, c'est vrai, mais bien évidente quand même... » (MACÉ, 6).

D'après DODGSON (7), « aucune bactérie ne peut prouver absolument que la pollution est d'origine humaine ; mais il y a des bactéries dont la présence, rattachée à d'autres circonstances — topographiques ou autres — donne la certitude presque absolue qu'elle soit d'origine « sewage » ». Et DODGSON, pendant 30 ans, a utilisé avec succès le *B. Coli* Commune comme indice de pollution des coquillages. Certains auteurs, nous dit-il encore, ont mis en avant le *Bacillus Enteridis Sporogenes* (*B. Welchii*) et le *Streptocoque* comme indicateurs de pollution : le premier indiquerait une pollution ancienne, le second une pollution récente. Mais DODGSON lui dénie toute signification.

On a proposé la recherche de l'Entérocoque à la place de celle du *B. Coli*. L'Entérocoque est en effet également un hôte normal de l'intestin. Mais il ne présente aucun avantage marqué sur le *B. Coli* ; au contraire, sa moindre abondance en rend la recherche plus délicate.

Quant au *Bacillus lactis aerogenes* qui a été également proposé en place du *B. Coli*, nous n'insisterons pas sur son emploi, puisque c'est un germe très voisin du *B. Coli*, dont beaucoup de méthodes ne le différencient pas.

L'indication de souillure fécale fournie par le *B. Coli* a donc été très généralement reconnue. Comme d'autre part, ce microbe possède certains caractères biochimiques constants qui en permettent un diagnostic relativement facile et sûr, il est devenu le « signal d'alarme » universel du contrôle des eaux¹. Sa présence dans une eau devint

¹ En outre, il est un facteur important que l'on a trop tendance à négliger et qui est la toxicité propre du *B. du Colon*.

H. Vincent (40) a montré que les filtrats des bouillons de culture de colibacilles renfermaient deux toxines, une exotoxine

synonyme de : « Contamination fécale - Danger ». Son absence n'implique pas la sécurité absolue, elle signifie du moins le défaut de cette souillure fécale, c'est-à-dire la non-présence de germes intestinaux pathogènes.

Cependant, ce point de vue fut l'objet de plusieurs critiques dont la principale était : le B. du Colon existe à l'état normal dans le sol ; sa présence dans les eaux de ruissellement n'a donc pas de signification. Or, les travaux de VINCENT, de BOUQUET et MARREC, qui ont recherché le B. Coli dans des terres d'origine différente, ont montré que ce germe n'existe pas dans les terrains incultes et inhabités, mais qu'on le retrouve constamment là où l'homme vit. BESSON résume ainsi la question (3) : « ...on sait que le colibacille peut vivre à l'état saprophytique dans les milieux extérieurs, et qu'il existe dans les excréments des poissons. Il s'ensuit que les auteurs n'ont pu encore se mettre d'accord sur l'importance qu'il faut attacher à la présence du colibacille dans les eaux, présence d'ailleurs très fréquente. Actuellement, sous l'influence des travaux de PETRUSCHKY et PUSCH, de VINCENT et de GARTNER, on tend à attacher une plus grande signification à l'abondance qu'à la *présence* du colibacille dans une eau. Il importe donc de procéder non seulement à la recherche, mais encore à la numération du colibacille (colimétrie) ; les méthodes modernes s'efforcent toutes de répondre à ce desideratum. »

On fut donc amené à « chiffrer » en colibacilles la potabilité d'une eau. Quelle échelle d'appréciation allait-on se fixer ? Il était difficile de fournir une réponse générale

neurotrophe et une endotoxine entérotrophe. Le même auteur prouve que le Bact. Coli est responsable de nombre d'états infectieux, septicémiques ou localisés, dont la gravité peut être très grande : fièvres prolongées simulant la fièvre typhoïde, appendicite gangréneuse, pyélonéphrite suppurée, cholécystite, etc...

s'appliquant à n'importe quelle eau. Il faut tenir compte en effet des autres facteurs associés : physiques, chimiques, hygiéniques, géologiques. On fut amené cependant à établir des échelles d'appréciation s'appliquant à la majorité des circonstances dans notre pays.

Voici les estimations proposées par VINCENT :

10.000 à 50.000 colibacilles par litre	Eau dangereuse
1.000 à 10.000 — — — — —	— mauvaise
100 à 1.000 — — — — —	— suspecte
50 à 500 — — — — —	— médiocre
10 à 50 — — — — —	— bonne

L'échelle donnée par MIGUEL est plus sévère :

Eau très pure	0 B Coli par litre
— potable	1 à 10 — — — — —
— suspecte	10 à 50 — — — — —
— mauvaise	plus de 50 — — — — —

A ces deux notions de *présence* et d'*abondance* du colibacille, on tend actuellement à ajouter celle de *l'origine*, basée sur des méthodes de différenciation. Nous verrons au chapitre suivant quels sont les principaux procédés satisfaisant chacune de ces trois notions.

En résumé, la « colimétrie » ne prétend pas répondre avec une rigueur absolue à la question suivante de l'hygiéniste : Telle eau peut-elle sans danger microbien être livrée à la consommation humaine ? Mais elle fournit de très grands services en permettant les expertises suivies de surveillance et de contrôle.



CHAPITRE II

BREF APERÇU DES DIFFÉRENTES MÉTHODES DE NUMÉRATION DU B. DU COLON

« Avant de voir comment on recherche le *Bacterium Coli*, demandons-nous ce que signifie ce terme.

Qu'est-ce donc que le *Bacterium Coli* ?

Le *Bacterium Coli* Commune, appelé encore *Escherichia Coli* ou plus couramment Bacille du colon ou Colibacille fut découvert en 1882 par ESCHERICH. C'est la bactérie type de l'espèce *Escherichia*, de la tribu des *Bacteriae*, de la famille des *Bacteriaceae* (8).

Les caractères de l'espèce *Colibacille* sont ainsi définis par BESSON (3) :

« Bacille aérobic facultatif, plus ou moins mobile, dépourvu de capsule, à extrémités arrondies, ne possédant pas de spores, ne prenant pas le Gram, ne liquéfiant pas la gélatine, attaquant le lactose avec production de gaz, produisant des gaz aux dépens de tous les sucres qu'il attaque, réduisant le rouge neutre, produisant fréquemment de l'indol. »

L'espèce comprend un grand nombre de *racés* ou de *variétés de racés*, dont l'une est constituée par le Colibacille type d'Escherich. Les diverses racés diffèrent les unes des autres par certaines de leurs propriétés biologiques ; c'est ainsi que le Colibacille type d'Escherich produit de l'indole et ne fermente pas le saccharose, alors qu'il existe des racés anindologènes et que d'autres attaquent le saccharose. Ces variations ont servi à plusieurs auteurs, notamment BESSON et Mac CONKEY, pour tenter un classement des colibacilles. Mais le problème est ardu et l'on s'en tient le plus souvent aux limites de l'espèce.

Le nombre des méthodes ayant pour but de doser le B. Cöli dans les eaux est considérable. Toutes sont fondées sur un moyen de diagnostic répété selon une méthode permettant la numération. Pour établir le diagnostic, chacune d'elles tend à mettre en évidence un ou plusieurs caractères du B. Coli ; les plus couramment utilisés sont les fermentations sucrées (surtout du lactose), la désintégration de certaines matières protéiques (formation d'indole), la réduction de matières colorantes (rouge neutre), la résistance élective du germe à certains antiseptiques (par ex. acide phénique) ou à une température relativement élevée, etc...

Nous n'entreprendrons pas de décrire toutes ces méthodes ; il faudrait pour cela des volumes. Nous nous bornerons à essayer le classement des principales d'entre elles. Nous verrons d'abord les *réactions de diagnostic*, correspondant à la notion « présence » du B. Coli, les *modés de numération*, répondant à la notion « quantité », enfin les *méthodes de différenciation* répondant à celle de « qualité ».

I. — REACTIONS DE DIAGNOSTIC DU B. COLI

1) DIAGNOSTIC BASÉ SUR L'UTILISATION D'UN SEUL CARACTÈRE DU GERME

A) Utilisation de facteurs « empêchants »

a) Résistance à la température.

Procédé de RODET¹ (9), basé sur ce fait que le B. Coli cultive encore à la température de 45°, contrairement à la plupart des autres bactéries.

b) Résistance à l'action antiseptique de l'acide phénique.

Procédé de CHANTEMESSE et WIDAL. - Le B. Coli se développe dans les milieux de culture additionnés de 1 pour 400 d'acide phénique, alors que la plupart des autres bactéries sont tuées.

c) Résistance à l'action antiseptique de la bile.

La bile ou les sels biliaires jouent un rôle analogue à celui de l'acide phénique. On a proposé les milieux biliés suivants :

- Bile peptonée glucosée, recommandée par DUJARRIC DE LA RIVIÈRE (10).
- Bile glucosée (milieu de GRYSEZ et PERET).
- Milieu au taurocholate de soude de Mac CONKEY.
- Bile et vert brillant, recommandés par MUER et HARRIS (11).

¹ Ce procédé, ainsi que le suivant, visait également à l'isolement du Bacille d'Eberth. L'expérience a montré qu'ils ne permettent pas d'isoler celui-ci, lorsqu'il est mélangé au B. Coli.

B) Fermentations sucrées

Fermentation du lactose.

Méthode Standard américaine (12) basée sur le diagnostic des germes du « groupe Coli-Aérogenes » par la fermentation du lactose avec production de gaz. Elle prévoit trois stades :

- Ensemencement de l'eau à analyser dans des tubes à fermentation de bouillon peptoné lactosé ; lecture en 24 ou 48 heures (test de présomption).
- Repiquage sur milieu solide lactosé : gélose d'Endo (lactose-fuchsine bisulfitée) ou gélose de Teaque-Levine (lactose-éosine-bleu de méthylène). (Test de confirmation).
- Repiquage sur bouillon lactosé et gélose inclinée. (Test complet.)

C) Production d'indole

On ensemence avec l'eau à analyser des milieux nutritifs contenant du tryptophane, lequel est attaqué par le B. Coli et transformé en indole. Un grand nombre de réactions chimiques permettent de caractériser l'indole formé, soit dans le bouillon de culture lui-même, soit de préférence après entraînement par distillation. On a utilisé les réactions suivantes :

- a) *Réaction de SALKOWSKY*, utilisée la première fois pour la diagnose par KITASATO. C'est une réaction de diazotation : l'indole donne avec l'acide nitreux une coloration rouge ou rose due à la formation de nitroso-indole. L'acide nitreux est produit par la décomposition d'un nitrite alcalin par un acide fort. L'alcool amylique collecte la coloration. Diverses techniques utilisent cette réaction ; citons :

- GRUBBS et FRANCIS (13), concentration de la coloration à la surface de séparation des réactifs.
- NENCKI, extraction à l'éther.
- NONOTTE et DEMANCHE (14), opération à chaud.
- b) *Réaction de LEGAL-WEYL.* Un milieu contenant de l'indole devient rougeâtre par addition de nitroprussiate de sodium alcalin, et vire ensuite au bleu-vert par addition d'acide acétique.
- c) *Réaction au papier oxalique.* Du papier-filtre imprégné d'acide oxalique se colore en rose si on le suspend au-dessus d'un milieu contenant de l'indole.
- d) *Réaction de FLEIG et SICRE (15),* reposant sur la coloration jaune que donne l'indole en présence de furfural et d'acide chlorhydrique.
- e) *Réaction de BUARD, à la vanilline (16).*
- f) *Réaction d'EHRlich (17),* extrêmement sensible. L'indole en solution dans l'eau donne une coloration rouge intense en présence de diméthyl-amino-benzaldéhyde. Parmi les techniques appliquées à cette réaction, celle de PORCHER et PANISSET (18) et celle de BERTHELOT (19) comportent toutes deux une extraction étherée.

D) Action sur les matières colorantes

La plus utilisée est le *rouge neutre* (neutral roth):

Le *B. Coli* a une action très nette sur ce colorant qu'il réduit : la teinte d'un beau rouge du milieu coloré au rouge neutre devient sous son influence vert fluorescent ou même jaune canari avec reflets fluorescents.

Cette réaction, en relation directe avec le pH du milieu, est favorisée par un pH alcalin. On la pratique quelquefois en milieu sucré, à tort à notre avis, car le pH du milieu

devenant rapidement acide sous l'effet de la fermentation sucrée, le colorant se trouve modifié ; il se superpose alors deux réactions qui se contrarient mutuellement.

Le rouge neutre a été utilisé par SAVAGE pour la recherche du *B. Coli* dans les eaux ; le milieu de SAVAGE est du bouillon glucosé au rouge neutre. Ce même milieu est utilisé dans la technique simple de A. BRAUN.

ROCHAIX (20) a fait de cette réaction une méthode rapide de contrôle de la contamination globale des eaux.

2) DIAGNOSTIC BASÉ SUR L'UTILISATION DE DEUX OU PLUSIEURS CARACTÈRES DE *B. COLI*

Procédé de VINCENT (21). Il consiste à cultiver l'eau suspecte en milieu phéniqué à 1 pour 1.000, à la température de 41°5. C'est la synthèse des procédés de RODET et de CHANTEMESSE et WIDAL.

Procédé de PÉRÉ (22), modification du procédé de VINCENT permettant l'ensemencement des plus grandes quantités d'eau, ce qui est nécessaire lorsque l'eau est peu polluée.

Procédé de POUCHET et BONJEAN (23). Variante du procédé de VINCENT. La culture est inoculée à un cobaye.

Procédé de MIQUEL. Culture en eau phéniquée à 1,25 pour 1.000 à la température de 42°.

Procédé de DIENERT (Service de surveillance des eaux de Paris). Culture en milieu phéniqué à 41°5, puis recherche de l'indole.

Procédé de BESSON (3). Combinaison de la fermentation gazeuse du lactose et de la réduction du rouge neutre (tubes B lactosés).

Procédé d'ELIKMÄNN. Fermentation du glucose à 46°.

Procédé de LACOMBE. Fermentation du glucose à 46°

et réduction du rouge neutre (combinaison des procédés d'EIJKMANN et de SAVAGE).

Procédé de l'INSTITUT BOUISSON-BERTRAND, de Montpellier (24). Utilisation d'un milieu lactosé tournesolé et culture à 44°.

Procédé de la SOCIÉTÉ SUISSE DES CHIMISTES ANALYSTES (25). Ce procédé utilise concurremment trois milieux :

- gélose glucosée au rouge neutre.
- bouillon lactosé.
- bouillon mannité à 43°.

Procédé du MINISTÈRE DE LA SANTÉ BRITANNIQUE (12). Procédé utilisant la fermentation du lactose avec formation d'acide et de gaz et la culture sur un milieu gélosé à 0,5 % de sel biliaire.

Procédé dit TROIS ÉTOILES DE HOUSTON. Ce procédé utilise un milieu au lactose, tournesol et taurocholate de sodium. Il admet un contrôle éventuel par épreuves secondaires, comprenant notamment la recherche de l'indole.

II. — MODES DE NUMERATION

Variables avec chaque méthode, les modes de numération sont basés sur desensemencements initiaux dans le milieu de culture choisi d'un ou plusieurs volumes d'une ou plusieurs dilutions d'eau. On considère comme contenant au moins 1 B. Coli toute portion d'eau qui a donné une réaction positive. On en déduit fort simplement le nombre de germes par unité de volume de l'eau analysée.

L'échelle couverte est d'autant plus vaste que le nombre des dilutions est grand. La précision de la numération est d'autant plus grande que, pour chacune des dilutions, le nombre desensemencements est grand. Comme on ne

peut multiplier les ensemencements en trop grand nombre, les différents modes de numération sont partagés entre le souci de la précision et celui de la commodité. Mais si l'on connaît à l'avance la richesse approximative de l'eau en *B. Coli*, le problème sera évidemment facilité.

III. — METHODES DE DIFFERENCIATION (ORIGINE DU *B. COLI*)

Les méthodes de diagnostic que nous avons passées en revue ne prétendent pas mettre en évidence telle ou telle race définie de *B. Coli*, ni même l'espèce *Colibacille*, dont nous avons donné la définition.

Il va de soi que la détermination de l'un ou de quelques-uns des caractères cultureux ou biochimiques d'un microbe ne suffit pas à l'identifier. Les méthodes de diagnostic ne fournissent donc pas un résultat bactériologiquement défini, mais permettent d'indiquer selon toute probabilité la contamination de l'eau envisagée, en permettant par là la surveillance et le contrôle.

Mais dans certains cas (expertises, recherches...), il est nécessaire de pousser plus loin l'analyse. On cherche en particulier à préciser le caractère fécal ou non fécal du germe de contamination, et à différencier le *B. Coli* des germes voisins ou associés, tels que le *B. lactis aërogènes*. Dans ce but, de nombreuses réactions additionnelles ont été proposées.

— La plus classique d'entre elles est l'*échelle d'indole de DIENERT et GUILLERD* (26) ; d'après ces auteurs, le *B. Coli* produit un taux d'indole d'autant plus élevé qu'il a été plus récemment émis par l'intestin. Une gamme étalon préparée avec une solution titrée d'indole permet d'évaluer la quantité d'indole produit par le microbe.

Les autres réactions les plus usitées sont :

- *La réaction du rouge de méthyle.* Un milieu glucosé — ou saccharosé — fermenté par le *B. Coli* atteint un pH assez bas pour faire virer au rouge vil le rouge de méthyle (pH 4,6).
 - *Les réactions de VOGES-PROSKAUER et de LEMOIGNE* consistent toutes deux à mettre en évidence l'acétyl-méthyl-carbinol $\text{CH}_3 - \text{CHOH} - \text{CO} - \text{CH}_3$, corps cétonique produit par le *B. lactis aérogènes* (et non par le *B. Coli*) au cours de la fermentation du saccharose. L'acétyl-méthyl-carbinol est oxydé en diacétyl $\text{CH}_3 - \text{CO} - \text{CO} - \text{CH}_3$, lequel fournit les réactions de VOGES-PROSKAUER (coloration rose avec les peptones) et de LEMOIGNE (coloration en présence d'un sel de nickel).
 - Les réactions utilisant des milieux spéciaux au citrate de sodium (*Réaction de KOSER*) et à l'acide urique dans lesquels le *B. Coli* ne peut se développer, contrairement au *B. lactis aérogènes*.
 - L'action du *B. Coli* sur le saccharose, proposée par MAC CONKEY, sur l'adonite, proposée par MAX LEVINE, etc..
-

CHAPITRE III

NECESSITE D'UNE METHODE STANDARDISEE EN FRANCE

Nous avons vu le nombre considérable des méthodes destinées à rechercher et à numérer le B. Coli dans les eaux. Quelle valeur respective doit-on leur attribuer ? Répondre à cette question est hors de notre compétence. Notre conviction est d'ailleurs que la plupart d'entre elles sont excellentes, lorsqu'elles sont prises isolément et effectuées *dans les conditions exactement définies par leurs auteurs.*

Il ne fait aucun doute qu'il n'y a pas actuellement en France deux laboratoires employant la même méthode, avec des moyens et des matériaux identiques. Citons à ce sujet la probante enquête effectuée en 1924 par P. VIGNE et R. CRÉMIEU (27). Ils posèrent à dix-huit laboratoires officiels français la question suivante : Quelle méthode employez-vous pour la détermination et la numération du Colibacille ? Réponses : dix-huit méthodes ou variétés de méthodes. Or, nous l'avons vu, les divers procédés, diffé-

rents par leurs exigences, *ne parlent pas le même langage*. Et même, trouverait-on deux méthodes qui parleraient le même langage, c'est-à-dire qui, pour un même échantillon d'eau, fourniraient le même chiffre, il faudrait encore se mettre d'accord sur la signification à donner à ce chiffre.

En résumé, soumettons un échantillon d'eau à l'analyse de deux laboratoires : nous obtiendrons deux résultats différents ; soumettons un résultat identique à deux hygiénistes, ils en tireront probablement une interprétation différente.

Mettons-nous maintenant à la place du législateur dont le rôle est de protéger la santé publique, du conseil municipal qui doit se prononcer sur telle adduction d'eau, ou simplement du particulier qui désire savoir s'il peut boire l'eau de son puits ; pour plus de sûreté, ils s'adresseront à deux laboratoires différents : devant des réponses divergentes, leur embarras sera grand et, comme le disent P. VIGNE et R. CRÉMIEU, « le prestige des hommes de laboratoire ne saurait qu'y perdre. »

Il y a longtemps que les bactériologistes ont senti le besoin d'unifier leurs techniques. En 1898, L. GRIMBERT publiait un article intitulé « De l'unification des milieux de culture en bactériologie » (28), où il déplorait la qualité très variable des peptones utilisées dans les milieux de culture. En ce qui concerne plus particulièrement l'analyse des eaux, Jules COURMONT écrivait en 1914 dans son traité écrit avec Ch. LESIEUR et ROCHAIX : « Il serait bien à désirer qu'on admît une *méthode officielle d'analyse* (milieu, nombre de jours de numération, température des étuves, etc...). Les lectures de chiffres seraient alors comparables. »

En 1924, P. VIGNE et R. CRÉMIEU (27) réclamaient au XI^e Congrès d'Hygiène l'établissement par une commission « d'une formule uniforme que chacun devra suivre, même sans conviction ». Au Congrès d'Hygiène de l'année

suivante, le Professeur ROCHAIX présentait un rapport détaillé sur la standardisation des méthodes d'analyse bactériologique des eaux (29). L'auteur y distinguait les méthodes d'analyse à appliquer à l'eau destinée à faire l'objet d'un projet d'adduction et les méthodes d'analyse à appliquer pour la surveillance des eaux. Il préconisait pour les expertises de surveillance l'emploi d'un milieu au rouge neutre et concluait en faveur de la standardisation des méthodes d'analyse. Il pensait cependant que la standardisation des résultats était très délicate.

Il nous est difficile d'ajouter à un avis aussi éclairé. Mais il faut constater que, malgré ce rapport, aucune méthode officielle n'a été promulguée en France depuis 1925 et que le problème en est toujours au même point¹. Puisqu'actuellement, les Pouvoirs Publics semblent tendre vers un contrôle sanitaire plus rigoureux et mieux ordonné, le moment nous semble opportun de présenter la méthode qui a été mise au point dans un but de standardisation au laboratoire de Bactériologie de l'Institut de Recherches d'Hygiène.

Cette méthode, nous n'avons pas la prétention de la croire en elle-même supérieure à toutes les autres. Nous dirons à son actif qu'elle a été jusqu'ici appliquée à plus de 1.000 échantillons d'eau de la ville de Marseille avec succès, en ce sens que les résultats fournis s'accordent parfaitement avec les autres données et peuvent, par conséquent, être considérés comme rationnels. Nous dirons aussi qu'elle possède les trois conditions qui, à notre avis, sont nécessaires pour qu'une méthode d'analyse bactériologique puisse être standardisée, à savoir :

¹ Aux Etats-Unis, l'American Public Health Association publie périodiquement des éditions corrigées des « Standard Methods » d'analyses bactériologiques qui font foi dans ce pays.

1°) Un principe raisonnablement juste.

2°) Une technique exactement définie.

3°) Une simplicité la rendant accessible à tous les laboratoires ; cette simplicité s'appliquant aux matières premières (pas de réactifs difficiles ou coûteux à se procurer) et au matériel (pas de matériel spécial, tel qu'étuves réglées à des températures peu courantes...).

CHAPITRE IV

MISE AU POINT DE LA METHODE PROPOSEE

MODIFICATION DE LA METHODE STANDARD AMERICAINE

Lorsqu'au mois de mars 1941, le laboratoire de Bactériologie de l'Institut de Recherches d'Hygiène (alors Fondation Rockefeller) entreprit le contrôle systématique des eaux d'alimentation de la ville de Marseille, la méthode d'analyse adoptée fut exactement celle des « Standard Methods » américaines. Cette méthode, nous l'avons vu au chapitre II de ce travail, est composée de trois tests successifs, réalisant autant d'isolements microbiens ; ils sont tous basés sur la fermentation du lactose. Le résultat est exprimé en germes du « groupe Coli-Aérogènes ». Le laboratoire a effectué environ 1.500 analyses selon ce procédé. C'est l'examen et la comparaison des résultats obtenus qui nous ont amené à modifier cette méthode en nous basant sur deux faits principaux :

- 1°) L'examen des 1.500 analyses nous a montré que dans 97,2 % des cas, le résultat final (test complet) était

identique au résultat initial fourni par la lecture en 48 heures des tubes à fermentation de bouillon lactosé (test de présomption). De là, nous sommes amenés à ne conserver que le test initial, ce qui apportait un gain énorme de temps et de matériel. En même temps, ce gain nous laissait la place pour introduire une nouvelle épreuve, simple mais capitale, celle de l'indole — épreuve que nous exigeâmes des microbes ayant déjà fermenté le lactose. En ce qui concerne la valeur du facteur indole, qu'il nous suffise de citer la conclusion de la partie du rapport du Professeur ROCHAIX (déjà cité, 29) qui traite de la question : « Comme on le voit, en ce qui concerne l'indole, les résultats de la plupart des chercheurs de tous les pays concordent, et il faudra par conséquent tenir également le plus grand compte de la fonction indologène des colibacilles isolés des eaux. »

L'introduction de ce nouveau facteur donnait un caractère nouveau et plus rigoureux à la méthode, qui se trouvait alors constituée par la réunion de deux réactions appartenant aux deux groupes dont nous avons parlé au chapitre II : une réaction de diagnostic (fermentation du lactose) et une réaction de différenciation — précisant l'origine du microbe — (formation d'indole). La fermentation du lactose nous désigne les microbes du groupe « Coli-Aérogènes » avec une « présomption » qui, nous l'avons vu, se trouve contrôlée dans 97,2 % des cas. La production d'indole sélectionne dans ce groupe :

- a) Les colibacilles qui se rapprochent du type d'Escherich.
- b) Les germes associés d'origine fécale (généralement indologènes).

2°) La seconde modification apportée porte sur le mode

de numération. Jusque là, il consistait à ensemen-
cer *un* tube avec 0,1 cc d'eau, *un* tube avec 1 cc, *un* tube
avec 10 cc, et *un* tube avec 50 cc. Selon que les 4 tubes
— ou les 3 derniers — ou les 2 derniers — donnaient
un résultat positif, on disait : il y a 10.000 — ou 1.000 —
ou 100 — germes « Coli-Aérogènes » par litre d'eau.
On voit la faiblesse d'un tel procédé : soit, par exemple,
une eau contenant 5 germes dans 10 cc, le tube de
10 cc sera positif ; il y aura 1 germe dans 2 cc ; l'unique
tube de 1 cc de la méthode aura une chance sur deux
de renfermer ce germe et le résultat variera de 1
à 2 selon le cas. Soit maintenant une eau contenant
1 seul germe dans 10 cc, le tube de 10 cc sera encore
positif et le tube de 1 cc aura 1 chance sur 10 de ren-
fermer ce germe ; le résultat variera de 1 à 10 : 100
ou 1.000 colibacilles par litre, selon que cette chance
aura été satisfaite ou non ¹.

La solution apparaît évidemment bien simple : pour
1 tube de 10 cc, ensemen- 10 tubes de 1 cc, et pour
1 tube de 1 cc, ensemen- 10 tubes de 0,1 cc. Mais on
se heurte là à une grande difficulté matérielle du fait
du grand nombre de tubes nécessaires. C'est pourquoi,
sur le conseil du Dr M. RAYNAUD, nous avons choisi un
moyen terme, le mode des ensemcements dichoto-
miques, qui permet un recoupement simplifié. Consi-
dérons la série des tubes ensemcés : chacun est
ensemencé avec un volume d'eau égal à la somme des
volumes d'eau qui ont ensemcé les tubes précé-
dents. Nous avons, par exemple, la série : 0,5 cc - 1 cc -

¹ Et ceci en admettant une égale répartition des germes par
unité de volume, ce qui, à priori, n'a pas de raison d'être surtout
à des concentrations aussi faibles, mais ce que nous sommes
bien forcés d'admettre si nous voulons conserver une valeur
quelconque à toute méthode de dilutions.

1 cc - 2,5 cc - 5 cc - 10 cc. Soient les tubes 5 cc et 10 cc positifs, les autres négatifs ; nous ne dirons pas : il y a 1 germe dans 5 cc (soit 200 au litre), car les 4 premiers tubes renferment au total 5 cc et aucun germe ne s'y est manifesté ; mais nous dirons : il y a 1 germe dans le sixième tube, (10 cc) et ceci est confirmé par la présence d'1 germe dans la somme des 5 premiers tubes qui totalisent également 10 cc.

ETUDE DE LA FERMENTATION EN MILIEU LACTOSE

THÉORIE

On sait que le *B. Coli* est un véritable ferment lactique et agit comme tel.

Lorsqu'on ensemence dans les conditions ordinaires un milieu lactosé avec du *B. Coli*, il se dégage une grande quantité de gaz constitués par de l'hydrogène (environ les $\frac{2}{3}$ du volume total), de l'anhydride carbonique et des traces de méthane. On retrouve dans le milieu surtout de l'acide lactique (acide ordinaire de fermentation, inactif sur la lumière polarisée), un peu d'acide acétique et des traces d'acide formique, d'acide butyrique et d'alcool éthylique. Il en résulte une acidification du milieu qui atteint une certaine valeur limite (cette acidité limite exprimée en acide sulfurique par litre ¹ est de 3 gr. 35, pour une acidité initiale de l'eau peptonée lactosée de 0 gr. 7, d'après

¹ Ou exprimée en acide lactique, de 6 gr. 15.

BESSON, RANQUE et SENEZ [3]). Cette acidification est facile à mettre en évidence grâce à des indicateurs colorés incorporés au milieu.

MILIEU DE CULTURE LACTOSÉ

On utilisera de l'eau peptonée lactosée avec indicateur d'Andrade². Les tubes de ce milieu renfermeront une petite cloche renversée destinée à recueillir le gaz.

LA PEPTONE.

La peptone ne nécessite pas ici d'exigences spéciales ; il suffit qu'elle apporte la quantité d'azote assimilable nécessaire. N'importe quelle peptone pepsique ou pancréatique satisfaisant à l'essai du Codex conviendra.

LE LACTOSE.

Généralement, le lactose livré aux laboratoires est assez pur. Il sera d'ailleurs facile de contrôler cette pureté en vérifiant par les méthodes habituelles ses deux principales constantes :

— son pouvoir rotatoire

$$[\alpha]_D = + 55^{\circ}2.$$

— son pouvoir réducteur égal à 70, en supposant celui du glucose égal à 100.

L'INDICATEUR D'ANDRADE.

Nous avons renoncé à utiliser comme indicateur la

² La méthode standard américaine use d'un bouillon lactosé sans indicateur. Elle n'emploie l'indicateur d'Andrade qu'incorporé à un milieu solide, au cours du dernier test (test complet).

teinture de tournesol, vu son manque de sensibilité et sa tendance à la réduction dans les milieux.

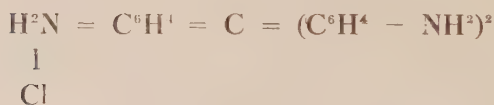
Nous avons adopté l'indicateur d'Andrade, constitué par le sel neutre incolore de la fuchsine acide. La fuchsine acide du commerce se présente sous l'aspect d'une poudre violacée, à reflets mordorés. Sa solution aqueuse est vivement colorée en rouge et se décolore par addition d'un alcali. Chimiquement, c'est un mélange de sels mono-acides de sodium et d'ammonium de pararosaniline et de rosaniline trisulfonées.

On sait que la pararosaniline (dont le chlorhydrate est la parafuchsine) et la rosaniline (dont le chlorhydrate est le fuchsine) sont des dérivés du triphénylméthane. Ce sont des corps à forme carbinol incolore, tandis que leurs chlorhydrates sont des colorants. Voici leurs formules :

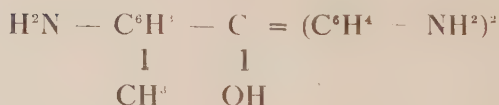
pararosaniline :



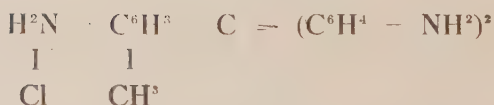
parafuchsine :



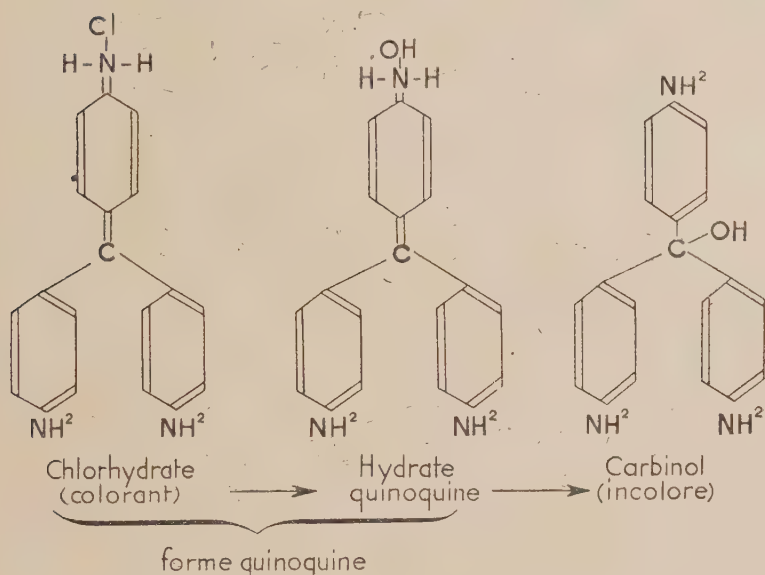
de même, rosaniline :



fuchsine :



Voici comment se forme le dérivé incolore sous l'action d'une base :



Préparation de l'indicateur d'Andrade.

Voici la préparation de l'indicateur d'Andrade telle qu'elle est donnée dans les Standard Methods de l'Etat de New-York (30) :

Fuchsine acide	0 gr. 1 — 0 gr. 5
Soude normale	16 cc.
Eau	100 cc.

Déterminer d'abord (pour chaque nouveau lot de fuchsine) la quantité de colorant nécessaire. Dissoudre cette quantité dans l'eau, ajouter l'alcali et mélanger soi-

gneusement. Laisser reposer une heure ou deux, filtrer sur papier et conserver dans une fiole jaune.

Pour déterminer la quantité de fuchsine à utiliser, préparer 5 lots d'indicateur d'Andrade contenant respectivement 0 gr. 1, 0 gr. 2, 0 gr. 3, 0 gr. 4 et 0 gr. 5, de colorant. Avec chacun de ces indicateurs, préparer quelques tubes inclinés d'eau peptonée lactosée gélosée contenant l'indicateur dans la proportion de 30 cc par litre. Ensemencer un tube de chaque lot avec une souche de *B. Coli* et un autre avec du *B. typhique*. Le milieu est considéré comme satisfaisant seulement s'il devient rouge sur toute sa longueur avec le *B. Coli* et reste entièrement incolore avec le *B. typhique* après 24 heures d'étuve à 37°. Choisir le milieu contenant la proportion la plus faible de colorant et donnant des résultats très nets. La concentration de fuchsine acide dans ce milieu est choisie comme standard pour ce lot de fuchsine et doit être notée sur le flacon.

Zone de virage de l'indicateur.

Nous avons cherché à déterminer à quel pH s'établissait la zone de virage de l'indicateur d'Andrade. Pour cela nous avons ajouté à de l'eau distillée neutre de l'indicateur dans la proportion de 30 cc par litre. Nous avons ajouté une solution acide très diluée jusqu'à ce que le milieu soit légèrement coloré en rose. Nous en avons réparti des quantités égales dans 15 tubes calibrés en verre neutre et avons laissé reposer. Nous avons alors ajouté à chaque tube une goutte d'une solution alcaline très diluée, puis attendu une heure. Nous avons répété cette opération jusqu'à ce que nous ayons obtenu une gamme dont le premier tube soit incolore et le dernier nettement coloré. Nous avons alors déterminé au comparateur de Hellige le pH de chaque tube. Le premier tube dont la coloration était perceptible (par transparence verticale) a montré un pH de 8,1. Le premier

tube dont la coloration fut franchement nette a donné un pH de 7,2. Nous en concluons que la zone de virage de l'indicateur d'Andrade est comprise entre 7,2 et 8,1, l'indicateur étant coloré en rouge en deça et incolore au delà.

LE PH DU MILIEU DE CULTURE.

Nous avons cherché quel était le pH optimum à fixer au milieu de culture lactosé. Il fallait pour cela tenir compte de la marche de la fermentation du lactose par le B. Coli et du point de virage assez bas de l'indicateur d'Andrade.

Après avoir préparé de l'eau peptonée lactosée selon la formule :

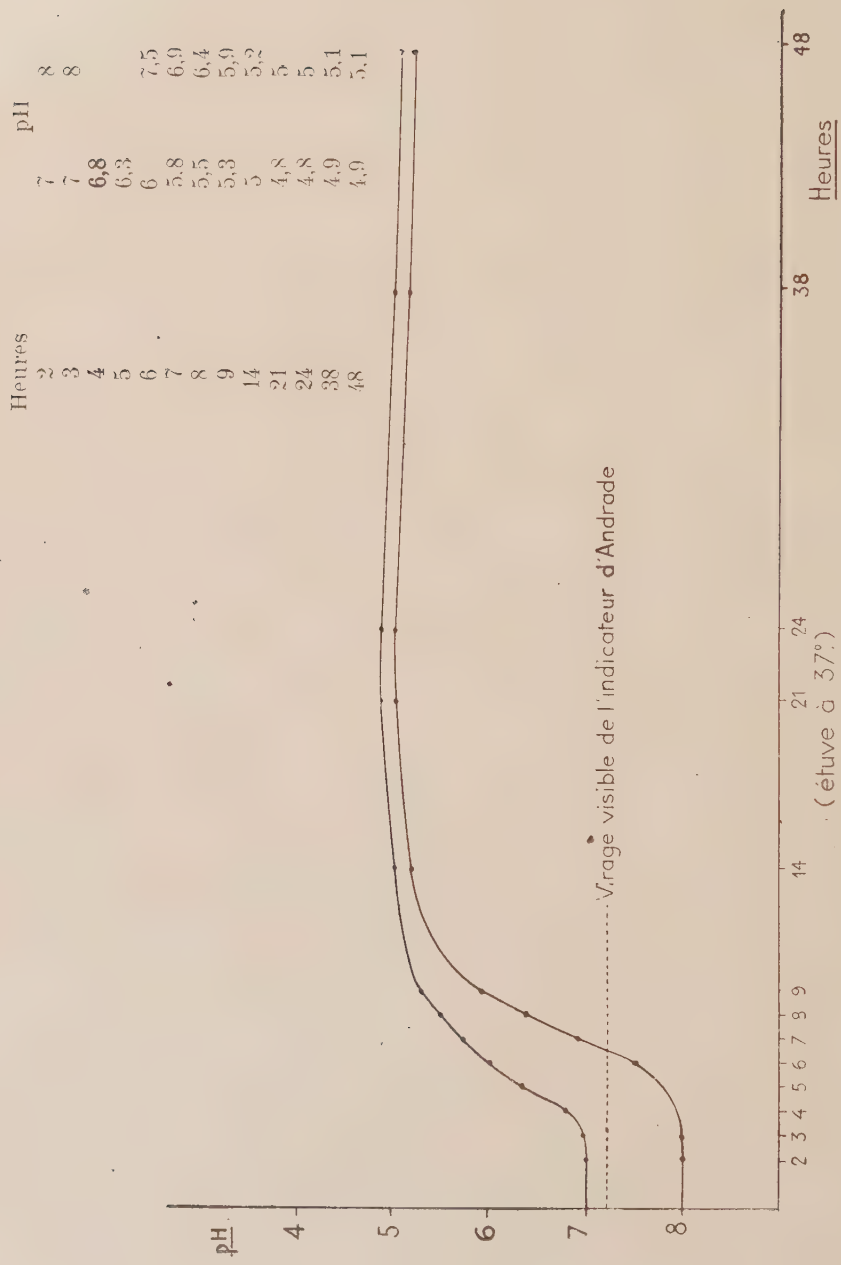
Peptone	15 gr.
Lactose	7 gr. 50 .
Eau distillée	1.000 gr.

nous avons ajusté exactement 500 cc de ce milieu à pH 7 et 500 cc à pH 8. Nous avons réparti chacun de ces deux milieux dans trois ballons :

1. Milieu 150 cc.
2. — —
3. — — et indicateur d'Andrade 4,5 cc.

Après stérilisation, nous avons ensemencé chaque ballon avec 1 cc d'une même émulsion d'une souche contrôlée de B. Coli. Nous avons placé à l'étuve à 37°. Sur des quantités prélevées aseptiquement, nous avons mesuré le pH des milieux. Les prélèvements eurent lieu toutes les heures pendant les 9 premières heures, puis à des temps plus espacés pendant 48 heures. Les mesures furent faites au comparateur de Hellige. Nous avons obtenu les deux courbes figurées ci-joint. Elles nous permettent de noter que :

- 1°) L'acidification commence à la 3^e heure de l'ensemencement.



1) Le point de départ alcalin, atteint son plafond entre 14 et 21 heures, puis décroît légèrement.

2°) Le point de départ alcalin à pH 8 ne paraît pas nuire à la marche de la fermentation.

3°) La courbe inférieure atteint la valeur de pH 7,2 (virage visible de l'indicateur d'Andrade) en 6 à 7 heures.

(Or, le ballon contenant l'indicateur a viré nettement au bout du même temps, ce qui correspond bien.)

En conclusion, nous avons choisi pH 8 pour l'établissement de notre milieu lactosé destiné à l'analyse des eaux. Ce point de départ n'est ni trop éloigné, ni trop rapproché du point de virage visible de l'indicateur d'Andrade (pH 7), ce qui lui confère une juste sensibilité.

APPLICATION DE LA RÉACTION LACTOSÉE A L'ANALYSE

Lorsque les tubes (contenant une cloche à gaz) du milieu lactosé auront étéensemencés avec l'eau à analyser, ils seront mis à l'étuve à 37° ; on effectuera ensuite la lecture. Comment et après quelle période d'incubation cette lecture sera-t-elle faite ?

Nous avons vu que nous disposons de deux facteurs d'appréciation : l'indicateur et la cloche à gaz. Le virage de l'indicateur est toujours extrêmement net et fidèle. La teinte obtenue va du rose vif au plus beau rouge ; parmi les milliers de tubes que nous avons ensemencés, nous n'avons jamais obtenu de teinte équivoque. La quantité de gaz produit est par contre très variable : elle va de 0 à 100 % de la longueur de la cloche à gaz. Quand doit-on

¹ Nous avons vérifié qu'elle commence en réalité à la première heure si le milieu a été préalablement porté à 37° avant l'ensemencement.

considérer le résultat comme positif ? Les auteurs sont d'accord pour accepter une petite marge dans la formation du gaz en égard à la possibilité de fermentations accessoires. La méthode standard américaine considère comme résultat négatif : pas de gaz ou « seulement une petite bulle ». DODGSON (7), plus net, considère comme positif « tout volume de gaz au moins égal à la taille d'un petit pois ». Nous avons choisi comme limite : 10 % de la hauteur de la cloche à gaz, ses dimensions étant définies plus loin (chapitre V).

Quant au temps d'incubation nécessaire, la méthode standard américaine préconise de noter les résultats au bout de 24 heures — ce qui élimine un certain nombre de résultats positifs — et au bout de 48 heures. Au cours des 1.500 analyses que nous avons ainsi effectuées selon le mode américain, nous avons noté les résultats en 24 et 48 heures. Dans 85 % des cas, le résultat positif (ou négatif) était acquis en 24 heures. Il restait donc 15 % des tubes qui ne montrèrent plus de 10 % de gaz qu'après 48 heures d'incubation, ce qui obligeait de toute façon à attendre ce délai pour repiquer simultanément tous les tubes. Ce qui nous a amené à ne plus effectuer qu'une seule lecture après 48 heures d'étuve.

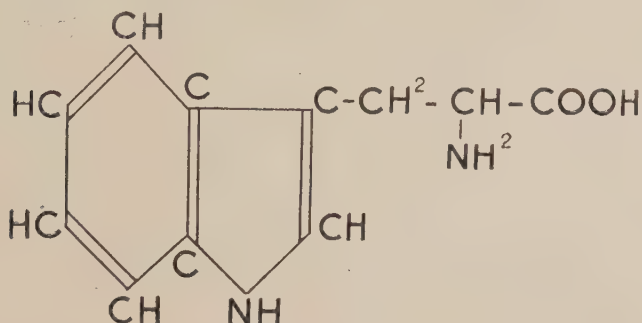
ETUDE DE LA FORMATION ET DE LA DETECTION DE L'INDOLE

THÉORIE

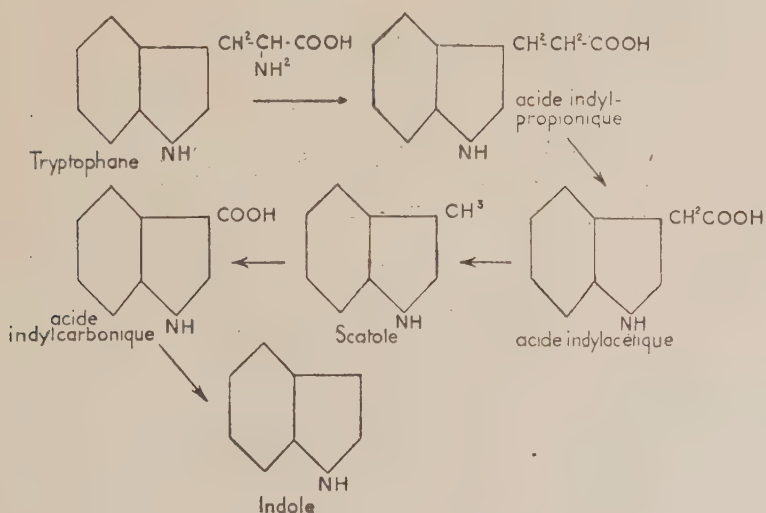
On sait que le *B. Coli*, en plus de son action de fermentation, possède également une action de putréfaction. En particulier, aussi bien « *in vivo* » (putréfaction intes-

tinale) qu' « in vitro », il est capable d'attaquer la molécule de tryptophane et de la transformer en indole.

Le tryptophane ou acide indole amino-propionique est un mono-peptide de la série hétérocyclique. Il répond à la formule :



L'action de démolition du *B. Coli* sur ce corps est classique. C'est la chaîne latérale qui est attaquée maillon par maillon ; par une série de désaminations et de décarboxylations alternées, elle est « brûlée » jusqu'au noyau cyclique qui, plus résistant, ne se laisse pas attaquer. Voici le schéma de cette démolition, tel qu'il a été établi par HOPKINS et COLE :



MILIEU DE CULTURE POUR LA RECHERCHE DE L'INDOLE

Si le *B. Coli* attaque le tryptophane, il est incapable de porter son attaque à un stade plus élevé de la protéolyse et de fabriquer lui-même cet acide aminé. Il faut donc lui « macher » le travail et lui fournir le tryptophane dans ses milieux de culture. On utilise généralement pour cela les peptones pancréatiques assez dégradées pour contenir une proportion notable de ce corps. La quantité produite sera proportionnelle à la quantité de tryptophane qui aura été mise en jeu. Or la peptone est loin d'être un corps chimiquement défini, étant un mélange en proportions variables d'albumoses et de peptone vraie. La richesse en tryptophane d'une peptone varie considérablement d'une marque ou d'une fourniture à l'autre. On conçoit que les résultats fournis par ce « réactif » indéfini soient peu sûrs. Pour remédier à cet état de choses, on a proposé de substituer aux solutions de peptones des milieux synthétiques à base d'acides aminés : ainsi les milieux au tryptophane de A. BERTHELOT (31) et de VALLE MIRANDA (32) et les milieux spéciaux étudiés en Allemagne : Trypsinbouillon de NEISSER et FRIEBER, Trypsinpeptononlösung de GERSBACH, Tryptophanbouillon de LAPINSKI (39). Ces milieux fournissent des résultats très sûrs, mais ils ont l'inconvénient d'être de préparation délicate et coûteuse ; s'ils conviennent parfaitement pour des travaux de recherche, il est difficile d'en demander l'usage à tous les laboratoires. Nous pensons qu'il serait plus adapté au but poursuivi de créer une « peptone standard pour la recherche de l'indole », comme l'ont conseillé PORCHER et PANISSET dès 1911 (33) : « Nous avons pensé qu'une digestion trypsique menée dans des conditions très précises de la caséine du lait de vache permettrait également d'obtenir un milieu relativement bien défini, en tous cas comparable à lui-même entre les mains de chercheurs différents ». C'est en effet le but à

atteindre. Mais, en attendant la création de cette peptone standard¹, nous pensons qu'il est possible d'utiliser dans de bonnes conditions certaines peptones pancréatiques, à condition d'exiger de ces peptones des caractères bien définis. Dans ce but, nous avons étudié 8 échantillons de peptones — pancréatiques ou non — appartenant à 7 marques différentes.

ETUDE COMPARÉE DE QUELQUES PEPTONES.

Voici les échantillons analysés :

Peptone A Peptone BYLA (réserve ancienne d'un an)

— A — (livraison récente).

— B Peptone RHONE-POULENC, pour bactériologie,
 exempte d'indole.

— C Peptone FRIEDR. WITTE, ROSTOCK (provenance de
 Lisbonne).

— D Peptonum siccum SIEGFRIED (provenance de
 Lisbonne).

— E Bacto-peptone DIFCO standard (provenance
 des Etats-Unis).

— F Peptone bactériologique « L'ORGANOTECHNIE »,
 Aubervilliers.

— G Peptone ROCHE.

¹ Aux Etats-Unis, la marque DIFCO fabrique une peptone standard spéciale pour la recherche de l'indole : la Bacto-Tryptone.

En France, la marque R. A. L. fournit également une peptone spécialement destinée à la recherche de l'indole ; nous n'avons malheureusement pas pu nous en procurer un échantillon.

Essais Codex.

Nous avons d'abord soumis ces échantillons aux essais indiqués par le Codex pour la peptone pancréatique. Nous avons opéré sur des solutés à 10 % de ces peptones dans de l'eau distillée. Voici les résultats obtenus :

		protéines		albumoses		diamino-diacides et polypeptides	Tryptophane libre
	Solution à 10 %	chaleur	NO ³ H	CCl ³ COH	SO ⁴ Am ² à sat.	acide phosphotungstique	Eau de Brome
A	trouble dépot	O	O	+	+	++	++
A'	trouble dépot	O	O	+	+	++	++
B	très trouble dépot	O	O	+	+	++	++
C	trouble dépot	O	O	++	++	++	leg +
D	leg. trouble	O	O	leg +	+	++	O
E	limpide	O	leg +	+	leg +	++	leg +
F	très trouble dépot	O	O	++	++	++	leg. +
G	leg. trouble	O	O	++	++	++	++

Tryptophane libre.

Voici comment nous avons effectué l'essai :

A 10 cc de la solution de peptone à 10 %, nous avons ajouté goutte à goutte de l'eau de brome saturée fraîchement préparée. Une coloration rouge apparaît dès la 5^e ou 6^e goutte pour les peptones A, A' et B, au bout de 10 gouttes pour les autres. Puis les colorations augmentent d'intensité et il se forme des précipités ; après addition de 60 gouttes, nous avons obtenu un précipité lie-de-vin abondant pour les peptones A, A', B et G, des précipités légers bruns plus ou moins violacés pour les peptones C, E et F, enfin un léger précipité jaune verdâtre pour la peptone D.

Les précipités obtenus avec les solutions A, A', B et G équivalent sensiblement à ceux obtenus en traitant de la même façon 10 cc d'une solution de tryptophane à 0,5 pour 1.000 (soit 5 milligr. de trypt.). On peut donc fixer à ces peptones le titre approché de 5 pour 1.000 de tryptophane libre.

Azote total et azote aminé.

Nous avons opéré avec une grande facilité le dosage de l'azote total par micro-kjeldahlisation. Prise d'essai : 5 cc d'une solution de peptone à 2 gr. pour 1.000 exactement (soit 10 milligr.). La minéralisation (catalyseur : SO⁴Cu et SO⁴K² à parties égales) dure de 2 à 3 heures. Dosage de l'azote ammoniacal à l'aide de l'appareil de Parnas et Wagner en suivant exactement la technique indiquée par J. MOITESSIER et A. ROCHE (34).

Quant au dosage de l'azote aminé, nous l'avons effectué selon la technique du Codex (azote au formol). Nous avons tout d'abord été gênés par la coloration des solutions peptonées pour saisir le virage de la phtaléine ; nous avons essayé la défécation au chlorure d'argent indiquée par cer-

tains auteurs, mais, si nous avons obtenu des solutions plus limpides, elles étaient tout aussi colorées. Nous nous sommes alors astreints à effectuer de nombreux dosages avec chaque peptone sans défécation et nous nous sommes habitués à saisir le virage avec une précision suffisamment grande.

Voici les résultats que nous avons obtenus :

	Azote total o/o	Azote des ac. aminés o/o	Azote des ac. aminés Azote total	Acidité libre en Cl H o/o
A	13,5	3,53	0,26	3,06
A'	13,5	3,58	0,26	3,06
B	13,8	3,36	0,24	2,48
C	12,9	1,51	0,12	2,19
D	16,1	1,36	0,08	1,35
E	16,2	2,36	0,14	1,06
F	12,95	1,65	0,13	6,06
G	13,5	2,97	0,22	4,45

Conclusion de l'essai Codex.

Aucun des échantillons examinés ne satisfait entièrement les exigences du Codex. Si nous écartons la peptone D qui n'est manifestement pas une peptone pancréatique, nous constatons que toutes les peptones montrent une nette présence d'albumoses et que toutes, sauf la peptone E, indiquent un azote total inférieur aux 14,5 % exigés par le Codex. Les peptones fournissant les résultats les plus voisins de ceux demandés par le Codex sont les peptones A, A', B et G.

Dosages de l'indole et du tryptophane total.

Pour que la peptone constitue un bon réactif dans la recherche du pouvoir indologène des bactéries, il faut :

1°) qu'elle ne contienne pas d'indole préformé ;

2°) qu'elle contienne suffisamment de tryptophane.

Nous avons effectué ces deux recherches sur les échantillons étudiés.

Dosage de l'indole.

Aucune des solutions peptonées, traitée par les réactifs habituels de recherche de l'indole, n'a donné de résultat positif. Nous nous sommes alors adressés à la technique très sensible donnée par Ch. PORCHER et L. PANISSET (35) : on agite 200 cc d'une solution à 2 % de peptone (4 gr.) avec 50 cc d'éther ; on décante, on disloque l'extrait éthéré avec quelques gouttes d'alcool et on évapore l'éther recueilli à 5 cc (ce qu'on fait commodément dans des tubes calibrés à l'avance). Nous avons en même temps préparé une gamme de tubes contenant 1, 2, 3, 4, 5, 6 millièmes de milligramme d'indole dissous dans 5 cc d'éther. A tous les tubes, nous avons ajouté 0,5 cc de solution à 5 % de paradiméthylaminobenzaldéhyde dans l'alcool à 95° (réactif d'Ehrlich) puis 1 cc de ClH fumant. Après agitation, nous avons bouché tous les tubes et comparé rapidement, car les colorations sont peu stables à ces faibles concentrations. Voici les résultats obtenus :

<i>Peptones</i>	<i>taux d'indole pour 100 gr. de peptone</i>
A, A', B	0,075 milligr.
C	ether d'extraction coloré en jaune (réaction illisible)
D, E	0,025 milligr.
F	0,1 milligr.

Dosage du tryptophane total.

Nous l'avons effectué suivant deux techniques différentes. Les résultats obtenus furent identiques.

1. Technique de FURTH et LIEBEN, citée par THOMAS (36).
2 cc de la solution de peptone à 5 % (0 gr. 1) sont additionnés d'une goutte de solution de formaldéhyde à 2 % et de 15 cc d'acide chlorhydrique concentré pur. Repos 10 minutes. On ajoute alors 12 gouttes d'une solution de nitrite de sodium à 0,05 %.

Après avoir fait parallèlement un témoin avec 1 cc d'une solution fraîche de tryptophane gauche à 1 pour 1.000 additionné d'1 cc d'eau distillée, nous avons comparé au colorimètre de Dubosc. La coloration obtenue n'est pas stable et la lecture au colorimètre est rendue pénible par les vapeurs d'acide chlorhydrique.

2. Réaction d'HOPKINS à l'acide glyoxylique¹, technique citée par P. MOLLIEUX (37).

Dans des tubes colorimétriques calibrés, nous avons mis des volumes variant de 0,1 à 0,5 cc des solutions de peptones à 2 % (soit de 2 à 5 milligr. de peptone), 2 cc d'acide glyoxylique à 40 % et 6 cc d'acide sulfurique pur concentré. Nous avons de même préparé la gamme suivante :

Tube n°	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
cc de solution de tryptophane à 1 p. 1.000.	1	0,9	0,8	0,7	0,6	0,5	0,4	0,3	0,2	0,1
cc d'acide glyoxylique à 40 % ..	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
cc d'SO ⁴ H ² concentré	5	5,1	5,2	5,3	5,4	5,5	5,6	5,7	5,8	5,9
soit de tryptophane, milligr.	0,1	0,09	0,08	0,07	0,06	0,05	0,04	0,03	0,02	0,01

¹ L'ancienne réaction colorée d'Adamkiewicz utilisait l'acide acétique. La réaction était due en réalité à l'acide glyoxylique contenu à l'état d'impureté dans l'acide acétique.

Cette gamme se conserve parfaitement plusieurs jours.
La comparaison fut très facile. Voici les résultats trouvés :

<i>Peptonès</i>	<i>Tryptophane total %</i>
A et A'	1
B	1,25
C	1
D	0,025
E	0,2
F	1
G	0,9

Il est à noter que les chiffres ci-dessus sont dans l'ensemble supérieurs à ceux donnés par les auteurs : de 0,1 à 0,5 % pour MOLLIEUX (37). Par ailleurs le chiffre minimum est fixé à 0,1 % (38).

*Essai bactériologique des différentes peptones
déjà analysées.*

Nous avons utilisé de l'eau peptonée faite avec les différentes peptones suivant la formule :

Peptone	30 gr.
Chlorure de sodium	5 cc.
Eau	1.000 cc.

Le milieu a été réparti en tubes par 5 cc, le pH ayant été ajusté à 7,2.

Nous avons effectué les essais suivants :

1. Sur des tubes *nonensemencés* des eaux peptonées A, B, C et D, nous avons effectué la réaction de SALKOWSKY avec alcool amylique, avant et après 48 heures d'étuve à 37°.

Les peptones A et D ont toujours fourni des anneaux amyliques incolores.

La peptone B a fourni des anneaux quelquefois légèrement teintés en jaune clair, coloration qui ne pouvait se confondre avec celle donnée par l'indole.

La peptone C a fourni des anneaux teintés de jaune et le milieu lui-même a plusieurs fois pris des teintes légèrement roses pouvant prêter à confusion.

Nous avons également recherché l'indole sur les tubes ensemencés avec une souche contrôlée de B. d'Eberth. Les résultats ont été les mêmes qu'avec les tubes non ensemencés.

2. Nous avons ensemencé les tubes en question avec une souche contrôlée de B. Coli. Nous ensemencions 2 tubes à chaque fois avec 1 cc. de la même émulsion microbienne, de façon à pouvoir faire la lecture en 24 et en 48 heures. On peut représenter ainsi les résultats obtenus :

	24 heures	48 heures	
A	+ + +	+ + +	(rouge cerise foncé)
B	+ +	+ + +	(id.)
C	+	+ +	(rouge grenadine)
D	0	0	

— Nous avons d'autre part ensemencé ces milieux avec plus de 100 germes fermentant le lactose isolés des eaux de Marseille ; la réaction de SALKOWSKY était effectuée après 48 heures d'étuve à 37°. La peptone A nous a toujours fourni des résultats très nets et constants. Les peptones B et G nous ont fourni des résultats analogues, mais quelquefois moins intenses. La peptone D a toujours fourni des résultats négatifs.

Conclusions tirées de l'étude des échantillons de peptones.

- 1° Seules les peptones A, B et G nous ont fourni des résul-

tats satisfaisants pour la recherche de l'indole, la peptone A s'étant montrée la meilleure.

Or, si nous consultons les chiffres de tryptophane total que nous avons trouvés dans les différentes peptones, nous voyons que les peptones C et F en possèdent une quantité égale à celle de ces trois peptones. Par contre, si nous nous reportons à l'essai du tryptophane libre (essai à l'eau de brome), nous voyons que les peptones A, A', B et G se détachent très nettement en avant du lot par l'intensité de la réaction. Il faut donc — pour la recherche de l'indole — attacher beaucoup plus de prix à la quantité de tryptophane libre contenue dans une peptone qu'à celle de tryptophane total. Ce qui confirme ce qu'indiqué A. BERTHELOT dans son étude sur le *Protéus* (31) : « ...toutes les cultures dont je me suis servi au cours de cette étude ont toujours été obtenues avec des milieux donnant par le brome la réaction de tryptophane libre. J'ai laissé systématiquement de côté l'étude des cultures dans lesquelles le *Protéus* aurait dû effectuer une dislocation préalable d'une molécule albuminoïde quelconque pour en libérer le tryptophane, car il m'aurait fallu tenir compte, non seulement des variations de l'activité d'attaque de cet amino-acide, mais encore de la variabilité des pouvoirs protéolytiques, peptolytiques et peptidolytiques. »

En conclusion, nous proposons d'exiger des peptones destinées à la recherche de l'indole, en plus des essais du Codex, un essai complémentaire qui pourrait être ainsi formulé :

« 10 cc. de la solution de peptone à 10 % auxquels on a ajouté petit à petit 60 gouttes d'eau de brome saturée, doivent présenter un abondant précipité lie-de-vin. »

2° Les traces d'indole que nous avons pu déceler dans les peptones étudiées ne gênent généralement pas la réaction dans les conditions pratiquées. Il sera nécessaire cependant d'effectuer toujours la réaction parallèlement sur un tube-témoin non ensemencé.

Le pH de l'eau peptonée.

Nous avons adopté le pH de 7,2 recommandé par de nombreux auteurs et nous nous en sommes toujours bien trouvés.

Influence des traces de lactose introduites dans le milieu peptoné au cours du repiquage.

On sait que la formation de l'indole est empêchée ou gênée par la présence de sucres dans le milieu. On aurait pu penser que lorsque l'on repique du bouillon lactosé en eau peptonée, l'ose introduisait une trace de lactose susceptible d'entraver la production de l'indole. Mais il nous apparut vite que la quantité introduite était par trop infime pour avoir une action quelconque. D'après RANQUE et SÉNEZ (41), il faut une quantité minima de 4 gr. de glucose par litre pour empêcher toute production d'indole dans les cultures. La marge de sécurité est donc grande.

APPLICATION DE LA REACTION DE L'INDOLE A L'ANALYSE

Il nous faut répondre aux mêmes questions qu'à celles posées par l'application de la réaction lactosée : comment et après quel temps d'incubation devra-t-on effectuer la lecture de la réaction ?

— Comment ? Nous avons vu que ce ne sont pas les techniques de mise en évidence de l'indole qui font défaut.

Le réactif d'Ehrlich est sans doute le plus sensible. Il est incontestable également qu'il soit bien préférable d'extraire l'indole du milieu de culture avant de le caractériser, ainsi que le recommandent A. BERTHELOT, PORCHER et PANISSET. Mais il faut distinguer les analyses courantes de laboratoire des travaux de recherche. Nous pensons d'autre part que lorsqu'on s'adresse à une flore microbienne aussi abondante et variée que celle des eaux, il est peut-être préférable de ne pas rechercher une *trop grande* sensibilité. Et nous avons constaté par ailleurs que la technique classique de SALKOWSKY-KITASATO, si on se donnait la peine de la bien définir et de l'utiliser toujours de façon identique, fournissait des résultats constants et extrêmement nets. C'est pourquoi nous avons adopté cette technique en raison de sa grande simplicité de procédé et de réactifs.

Nous avons effectué la réaction sur des tubes d'eau peptonée Byla (la peptone A des essais) ensemencés avec du B. Coli contrôlé en faisant varier les différents facteurs de la réaction. Voici les conclusions auxquelles nous avons abouti :

- 1° La quantité de nitrite de sodium utilisée doit être exactement mesurée (un excès diminue rapidement l'intensité de la coloration). La coloration optima a toujours été obtenue avec 5 gouttes de la solution de NO_2Na à 1 pour 1.000 (pour 5 cc. de culture).
- 2° Par contre, la quantité d'acide sulfurique n'a pas besoin d'être si exactement mesurée, 10 gouttes conviennent.
- 3° Les colorations se stabilisent. Attendre un quart d'heure avant de noter les résultats.
- 4° Le fait d'opérer à chaud, comme le conseillent NONOTTE et DEMANCHE (14), n'apporte pas un gain de sensibilité appréciable.
- 5° L'intensité de la coloration n'est pas proportionnelle à la quantité de germes ensemencés.

6° L'acide sulfurique employé doit être de l'acide pur (l'acide sulfurique R. P. pour analyses convient parfaitement. L'acide sulfurique est préférable à l'acide chlorhydrique.

7° Le résultat de la réaction ainsi pratiquée est presque toujours très net et l'emploi d'alcool amylique est généralement inutile. Cependant, dans le cas où on serait amené à utiliser ce dissolvant, il sera bon d'en vérifier la pureté. Pour cela, on pourra en traiter 20 cc. par le réactif d'Ehrlich ; on devra constater l'absence de coloration suspecte.

— Après quel temps de séjour à l'étuve devra-t-on lire les tubes ? Nous avons recherché après quel temps la réaction était perceptible. Nous avons pour cela ensemencé des tubes d'eau peptonée Byla avec 4 cc. d'une même émulsion d'une souche de *B. Coli* vérifiée. Après 7 heures d'étuve, la réaction de Salkowsky nous a fourni un résultat légèrement positif, cependant que la réaction d'Ehrlich fournissait déjà un résultat extrêmement net ; après 10 heures à 37°, la réaction de Salkowsky fournissait un résultat égal au 1/100.000 de l'échelle de Diénert.

Nous pensions donc que 24 heures d'étuve seraient suffisants dans tous les cas. Or, ayant effectué parallèlement des séries de lectures en 24 et 48 heures sur des tubes ensemencés avec des germes retirés des eaux, nous avons constaté que plusieurs coloration obtenues après 24 heures étaient beaucoup moins nettes — l'une même était nulle — alors que les mêmes cultures lues 24 heures plus tard fournirent des résultats positifs très nets. Malgré la perte de temps ainsi provoquée, nous avons donc décidé d'effectuer les lectures après 48 heures d'étuve à 37°.

CHAPITRE V

METHODE DE NUMERATION DU B. COLI DANS L'EAU

PRINCIPE DE LA MÉTHODE

Est considéré comme contaminé tout volume d'eau contenant au moins un germe qui :

1° fermente le lactose avec production de gaz et d'acide, en 48 heures, à 37° ;

2° produit de l'indole, en 48 heures, à 37°.

La durée de l'analyse est donc de 4 jours.

MILIEUX NÉCESSAIRES

Milieu 1: Eau peptonée lactosée avec indicateur d'Andrade.

Peptone	15 gr.
Lactose	7 gr. 50
Indicateur d'Andrade ¹	30 cc.
Eau	1.000 cc.

(1) Pour la préparation de l'indicateur d'Andrade, se reporter au chapitre IV.

Dissoudre la peptone dans l'eau en chauffant doucement et en agitant. Laisser refroidir ; ajouter l'indicateur d'Andrade, puis ajuster le pH à 8. Porter à l'ébullition, laisser refroidir, ajouter et dissoudre le lactose. Filtrer à travers papier et coton.

Répartir ce milieu comme suit :

- a) 40 cc. dans chacun des dispositifs à fermentation suivants :
un tube à essai de 32×160 mm. (contenance environ 110 cc.), contenant un petit tube renversé de 14×60 mm.
- b) 20 cc. dans chacun des dispositifs suivants :
un tube à essai de 27×160 mm. (contenance environ 80 cc.), contenant un petit tube renversé de 10×60 mm.
- c) 10 cc. dans chacun des dispositifs suivants :
un tube à essai de 20×160 mm. (contenance environ 45 cc.), contenant un petit tube renversé de 10×40 mm.
- d) 5 cc. dans chacun des dispositifs suivants :
un tube à essai de 14×150 mm. (contenance environ 22 cc.), contenant un petit tube renversé de 7×35 mm.

On autoclave les tubes 20 minutes à 115° . Au sortir de l'autoclave, les tubes sont rouges, mais se décolorent en refroidissant.

Milieu 2 : Equ peptonée pour la recherche de l'indole.

Peptone ayant satisfait aux essais....	30 gr.
Chlorure de sodium	5 gr.
Eau	1.000 cc.

Dissoudre la peptone et le sel en chauffant dou-

cement et en agitant. Laisser refroidir et ajuster le pH à 7,2. Porter à l'ébullition, laisser refroidir et filtrer sur papier et coton.

Répartir par 5 cc. dans des tubes à essai.

Autoclaver 20 minutes à 115°.

TECHNIQUE

On ensemence directement l'eau à analyser dans les tubes de bouillon lactosé. On lit après 48 heures de séjour à l'étuve à 37° et on repique tous les tubes positifs sur eau peptonée pour y rechercher l'indole.

1° Ensemencements. Chaque échantillon est numéroté.

Pour chaque échantillon, ensemençer 8 tubes de bouillon lactosé, tubes désignés par commodité par les lettres A B C D F G H et I. Les ensemencements sont ainsi faits :

Tube	Milieu	Eauensemencée
A	5 cc.	0,5 cc.
B	5 »	1 »
C	5 »	1 »
D	5 »	2,5 »
F	5 »	5 »
G	10 »	10 »
H	20 »	20 »
I	40 »	40 »

Mettre les tubes à l'étuve à 37°.

2° Après 48 heures, effectuer la lecture. On considère comme positif tout tube qui :

a) a viré au rose franc ou au rouge ;

b) montre une cloche remplie de gaz sur au moins 10 % de sa longueur.

- 3° Repiquer à l'anse de platine tous les tubes positifs sur des tubes du milieu 2 ; mettre ces derniers à l'étuve à 37°. Chaque nouveau tube reste désigné par le numéro de l'échantillon et par la lettre du tube de milieu lactosé à partir duquel il a étéensemencé. Placer en même temps à l'étuve un tube de milieu 2ensemencé avec une souche de *B. Coli* contrôlé (témoin positif) et un tube nonensemencé (témoin négatif).
- 4° Au bout de 48 heures, effectuer la recherche de l'indole comme suit :

Ajouter à chaque tube exactement 5 gouttes de solution de nitrite de sodium à 1 pour 1.000 et 10 gouttes d'acide sulfurique pur. Lire au bout d'un quart d'heure. Si la réaction n'est pas nette, ajouter 2 cc. d'alcool amylique et agiter doucement en évitant l'émulsion.

On considère comme positif tout tube dont le milieu est nettement coloré en rose ou en rouge, ou dans lequel l'anneau amylique s'est nettement coloré en rose ou en rouge aux dépens du milieu.

INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

Le *tableau I* montre la façon de noter les résultats.

Dans les colonnes verticales « lactose » et « indole », marquer par le signe + les résultats positifs et par le signe — les résultats négatifs. Dans la colonne « résultat final », marquer un + si les deux résultats correspondants sont +, un signe — dans le cas contraire. On considère comme contaminé un volume d'eau ayantensemencé un tube dont le résultat final est positif.

Pour traduire ces résultats en chiffres, c'est-à-dire pour obtenir le nombre de germes par litre, on tient compte du 2° *tube positif*, en lisant de A à I. Le *tableau II* donne les chiffres correspondants.

Tableau I

Date :				
Echantillon N°	Tube	Lactose 48 h.	Indole 48 h.	Résultat final
	A			
	B			
	C			
	D			
	F.			
	G			
	H			
	I			

Tableau II

[illegible]

S'il y a alternance de + et de —, tenir compte encore du 2^e tube positif.

A noter que pour rendre les résultats plus expressifs, ils sont exprimés en « B. Coli ». Ce terme, nous l'avons vu, est à la fois trop vague et trop précis. Dans le cas présent, ces B. Coli seront en réalité « les germes qui auront rempli les conditions de la méthode elle-même ».

*Note sur la détermination et l'ajustement du pH
des milieux de culture
au moyen du Comparateur de Hellige*

Le disque et la solution de Merck de rouge de phénol (échelle couverte : pH 6,8 à 8,4) conviennent bien pour le milieu 1. Pour le milieu 2, il sera préférable d'utiliser le bleu de bromothymol (échelle couverte : pH 6,0 à 7,6).

Détermination du PH.

Une remarque s'impose tout d'abord, c'est qu'il convient d'opérer sur les milieux refroidis, car on sait que le pH varie notablement avec la température¹. Le mieux est d'opérer aux environs de 37°.

Mettre le disque en place et mesurer dans chacune des

¹ Voici les chiffres que nous avons trouvés avec de l'eau distillée :

18°	pH 5,2	45°	pH 5,5
25°	— 5,4	90°	— 5,6

Avec le milieu 1, au contraire, le pH diminue avec l'élévation de température :

15°5	pH 7,9	30°	pH 7,75	60°	pH 7,4
20°	— 7,85	40°	— 7,65	70°	— 7,3
27°	— 7,8	50°	— 7,5	100°	— 7,1

Par refroidissement, le pH repasse exactement par les mêmes valeurs.

deux cuves 10 cc. du milieu. Dans la cuve de droite, ajouter avec une pipette extrêmement propre soit 0 cc. 25 de la solution de rouge de phénol, soit 0 cc. 5 de la solution de bleu de bromothymol. Mélanger soigneusement le colorant au milieu et faire tourner le disque jusqu'à égalité de teinte. Lire le pH dans la fenêtre inférieure.

Ajustement du pH

Préparer une solution de soude environ normale. Au moment du titrage, diluer exactement au 1/20 une partie de cette solution.

Placer le disque au pH que l'on veut obtenir. Mettre 10 cc. de milieu dans chacune des deux cuves. A l'aide d'une pipette de 2 cc. graduée en 1/10 de cc. — ou mieux, d'une microburette — verser dans la cuve de droite, goutte à goutte, et en agitant après chaque addition, la soude N/20 jusqu'à égalité de teinte¹.

Soient n cc. de soude N/20 nécessaires pour cela et soit N le nombre de cc. de soude N/1 nécessaires pour amener 1 litre du milieu au pH voulu.

$$N = \frac{n \times 100}{20} = n \times 5$$

Ajouter au milieu la quantité calculée de soude N/1, brasser et vérifier le pH. Porter alors le milieu à l'ébullition de façon à précipiter les substances insolubles au pH donné. Laisser refroidir et filtrer.

¹ Le milieu 1 contient déjà un indicateur : l'indicateur d'Andrade. Il ne gêne pas pour déterminer le pH du milieu ; mais lorsqu'on ajuste ce dernier, on verse de la soude dans la cuve de droite. Cette soude modifierait la teinte propre de l'indicateur d'Andrade et par suite fausserait la comparaison avec la cuve témoin. C'est pourquoi il faudra prendre soin d'ajouter au fur et à mesure les mêmes quantités de soude dans la cuve de gauche.

CHAPITRE VI

QUELQUES RESULTATS OBTENUS AVEC LES EAUX D'ALIMENTATION DE MARSEILLE

Du 1^{er} octobre 1941 au 1^{er} mars 1942, le laboratoire a analysé, selon la méthode que nous venons de décrire, 1.090 échantillons d'eau, prélevés en divers points du réseau d'alimentation marseillais. Les eaux analysées étaient soit des eaux brutes, soit des eaux prélevées à la sortie de l'un des deux bassins de traitement de Marseille, soit des eaux provenant de ces bassins mais prélevées après un parcours plus ou moins long dans les canalisations.

Voici à titre d'exemple un extrait du cahier de laboratoire consignant quelques résultats du 7 janvier 1942 :

Échantillon N°	Tube	Lactose 48h.	Indole 48h.	Résultat final	Nombre de B. Coli par litre
1	A	—		—	400
	B	—		—	
	C	+	+	+	
	D	+	+	+	
	E	+	+	+	
	F	+	+	+	
	G	+	+	+	
	H	+	+	+	
	I	+	+	+	
2	A	—		—	< 12
	B	—		—	
	C	—		—	
	D	—		—	
	E	—		—	
	F	—		—	
	G	—		—	
	H	+	—	—	
	I	—		—	

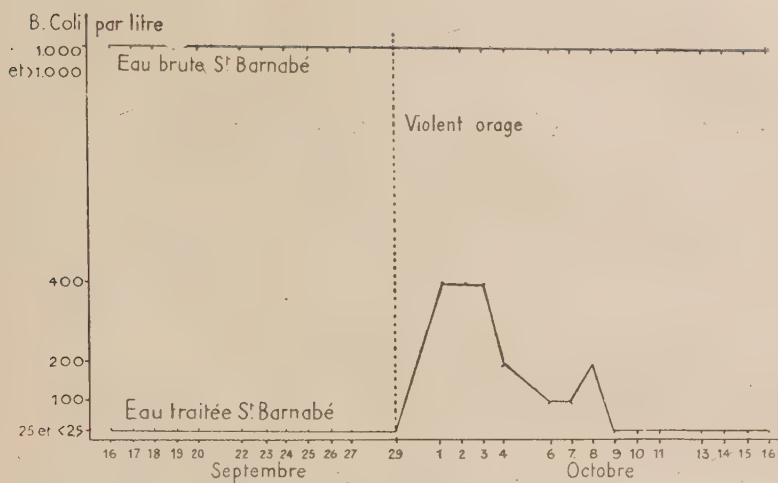
Echantillon n° 1 :

Eau à l'arrivée au bassin de Saint-Barnabé

Echantillon n° 2 :

Eau à la sortie du bassin de Saint-Barnabé

Les résultats obtenus nous ont permis de dresser une courbe pour chaque échantillon, courbe donnant la pollution de l'eau en question en fonction du temps. Soient par exemple les deux courbes obtenues avec les points de prélèvement situés *avant* et *après* le bassin de Saint-Barnabé ; leur juxtaposition permet de juger immédiatement l'épuration effectuée par le bassin. Voici par exemple la partie de ces deux courbes qui correspond à la période du 16 septembre au 16 octobre 1941 :



On notera la perturbation prolongée provoquée dans le bon fonctionnement du bassin par le très violent orage qui s'abattit sur la région de Marseille le 29 septembre.

CONCLUSIONS

- 1°) Soulignons encore une fois au terme de ce travail que la méthode que nous présentons a été mise au point *dans un but de standardisation* et qu'elle ne vise pas à être autre chose qu'un procédé raisonnable et simple de contrôle hygiénique des eaux.
- 2°) Avec de légères modifications de technique, il est évident que cette méthode pourrait être étendue au contrôle hygiénique du lait et des coquillages. Elle a d'ailleurs été utilisée avec succès au cours d'une longue enquête effectuée par le laboratoire sur la qualité hygiénique des laits consommés à Marseille.
- 3°) Nous sommes fortement d'avis qu'il y aurait avantage à étendre la « standardisation » ou unification à toutes les techniques d'analyses qui constituent la routine des laboratoires, qu'elles soient d'ordre chimique, biologique ou bactériologique. Le choix de ces méthodes qui deviendraient « officielles » serait laissé aux Pouvoirs Publics sur avis de commissions qualifiées. Si ce travail pouvait aider à construire un tel code, nous nous déclarerions satisfaits.

Vu et approuvé.

Le Doyen :

L. CORNIL.

Vu et approuvé.

Le Président de thèse :

H. VIOLLE.

Vu et permis d'imprimer.

Aix, le 26 mars 1942.

Le Recteur :

MARTINO.

Index Bibliographique

- (1) Jules COURMONT, Ch. LESIEUR et A. ROCHAIX. — Précis d'Hygiène, 5^e éd. (Masson).
- (2) Jean-Paul LANGLOIS. — Précis d'Hygiène (Octave Doin).
- (3) Albert BESSON. — Technique microbiologique (Baillière).
- (4) Ch. DOPFER et E. SACQUEPÉE. — Précis de Bactériologie (Baillière).
- (5) Dr Ed. IMBEAUX. — Qualités de l'eau et moyens de correction (DUNOD).
- (6) E. MACÉ. — Traité pratique de Bactériologie (Baillière).
- (7) DODGSON. — Report on mussel purification (Ministry of Agriculture and Fisheries, Londres).
- (8) Paul HAUDUROY. — Dictionnaire des bactéries pathogènes (Masson).
- (9) RODET. — *Comptes rendus de la Société de Biologie*, 1889, n° 26.
- (10) DUJARRIC DE LA RIVIÈRE. — *Revue d'Hygiène*, 1923, p. 60.
- (11) MUER and HARRIS. — *American Journal of Public Health*, t. X, 1920, p. 874.
- (12) Standard Methods for the examination of water and sewage (American Public Health Association, 1936).
- (13) GRUBBS and FRANCIS. — Ringtest for indol. (*Bull. of the Hygienic laboratory*, Washington, mai 1902).
- (14) NONOTTE et DEMANCHE. — Sur la recherche et le dosage de l'indol dans les cultures microbiennes. (*Comptes rendus de la Société de Biologie*, 1908, p. 495 et 658).

- (15) SICRE et ESCAILLON. — Recherche de l'indol dans les cultures microbiennes à l'aide du furfurol. (*Archives de l'Institut Pasteur de Tunis*, 1909, p. 21).
- (16) BUARD. — Recherche de l'indol dans les cultures microbiennes. (*Comptes rendus de la Société de Biologie*, LXV, 1908, p. 158).
- (17) EHRLICH. — *Med. Woche*, 1901, n° 15.
- (18) PORCHER et PANISSET. — Recherche de l'indol dans les bouillons microbiens. (*Comptes rendus de la Soc. de Biol.*, 1909, 1, p. 624).
- (19) A. BERTHELOT. — Recherches sur le *Protéus Vulgaris* (*Annales de l'Institut Pasteur*, 1914, p. 851).
- (20) A. ROCHAIX. — Recherche rapide de la contamination bactériologique des eaux de boisson (*Revue d'Hygiène*, 1917, 89, p. 472).
- (21) VINCENT. — Sur un procédé d'isolement du Bacille typhique dans l'eau (*Comptes rendus de la Soc. de Biol.*, 1^{er} février 1890).
- (22) PÈRE. — Contribution à l'étude des eaux d'Alger (*Annales de l'Institut Pasteur*, 1891, V, p. 79).
- (23) POUCHET et BONJEAN. — Contribution à l'analyse des eaux potables (*Annales d'Hygiène*, février 1897, p. 150).
- (24) J. SEVERAC. — Contribution à l'étude d'une méthode lactosée tournesolée pour la recherche du colibacille dans l'eau (Mari-Lavit, Montpellier).
- (25) Paul HAUDUROY. — Technique bactériologique élémentaire (Roth, Lausanne).
- (26) A. GUILLERD. — Notions d'Hydrologie (Béranger, Paris et Liège).
- (27) P. VIGNE et R. CREMIEU. — La standardisation des méthodes pour l'analyse bactériologique des eaux. (*Revue d'Hygiène*, 1924, t. XLVI, p. 1168).
- (28) L. GRIMBERT. — De l'unification des milieux de culture en bactériologie (*Archives de Parasitologie*, 1898, t. 1, p. 191).
- (29) M.-A. ROCHAIX. — Rapport sur la standardisation des méthodes d'analyse bactériologique des eaux. (*Revue d'Hygiène*, 1925, t. XLVII, p. 1148).
- (30) Standard Methods of the Division of Laboratories and Research of the New-York State Department of Health (2^e édition, 1939).

- (31) A. BERTHELOT. — Recherches sur le Protéus Vulgaris. (*Annales de l'Institut Pasteur*, 1914, p. 851).
 - (32) VALLE MIRANDA. — Contribution à l'étude du Protéus Vulgaris (*Thèse Faculté des Sciences*, Paris 1917).
 - (33) Ch. PORCHER et L. PANISSET. — Les diverses peptones et la formation d'indol (*Comptes rendus de la Soc. de Biol.*, 1911, I, p. 464).
 - (34) J. MOITESSIER et A. ROCHE. — Guide de travaux pratiques de chimie biologique et médicale pour la Faculté de Marseille, 1935, fascicule II.
 - (35) Ch. PORCHER et L. PANISSET. — De la recherche de l'indol dans les cultures microbiennes. (*Comptes rendus de la Soc. de Biol.*, 1910, t. I, p. 653).
 - (36) P. THOMAS. — *Manuel de Biochimie*, p. 281 (Masson).
 - (37) P. MOLLIEUX. — Analyse bactériologique des eaux potables, p. 64 (Le François).
 - (38) Traité de Microbiologie, publié sous la direction de L. NATAN-LARRIER, t. II, p. 997 (Doin).
 - (39) Arch. f. Hygiene, 1929.
 - (40) H. VINCENT. — Sur la pluralité des toxines du Bacillus Coli (*Comptes rendus de l'Académie des Sciences*, t. CLXXX, 2 juin 1925, p. 1624).
 - (41) RANQUE et SENEZ — Influence des sucres sur la production d'indol (*Comptes rendus de la Soc. de Biol.* 1921, 2, p. 937).
-

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION	13
CHAPITRE I. — <i>Eau potable et colibacille</i>	17
CHAPITRE II. — <i>Bref aperçu des différentes méthodes de numération du B. du Colon</i>	23
— Réactions de diagnostic du B. Coli....	25
— Modes de numération	29
— Méthodes de différenciation	30
CHAPITRE III. — <i>Nécessité d'une méthode standardisée en France</i>	33
CHAPITRE IV. — <i>Mise au point de la méthode proposée</i>	37
— Modification de la méthode standard américaine	37
— Etude de la fermentation en milieu lactosé	40
— Etude de formation et de la détection de l'indole	48
CHAPITRE V. — <i>Méthode de numération du B. Coli dans l'eau</i>	63
CHAPITRE VI. — <i>Quelques résultats obtenus avec les eaux d'alimentation de Marseille</i>	71
CONCLUSIONS	75
INDEX BIBLIOGRAPHIQUE	77

